

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/14567 A1

(51)国際特許分類: C12N 15/54, 9/12, 1/21, C12P 7/66

〒655-0851 兵庫県神戸市垂水区神和台1丁目13-13
Hyogo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP00/05659

(74)代理人: 安富康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.) ; 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

(22)国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願平11/237561 1999年8月24日 (24.08.1999) JP

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 鎌淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 01/14567 A1

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING COENZYME Q₁₀

(54)発明の名称: コエンザイムQ₁₀の製造法

(57) Abstract: A process for microbiologically producing coenzyme Q₁₀ at a high efficiency by using a gene of the synthesis of coenzyme Q₁₀ side chain originating in a fungus belonging to the genus *Saitoella*. A DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:1; a DNA having a base sequence derived from the base sequence represented by SEQ ID NO:1 by deletion, addition, insertion and/or substitution of one or more bases and encoding a protein having a decaprenyl diphosphate synthase activity; and a DNA being hybridizable under stringent conditions with the DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NO:1 and encoding a protein having a decaprenyl diphosphate synthase activity.

[統葉有]



(57) 要約:

Saitoellia 属に属する真菌類由来のコエンザイムQ₁₀の側鎖合成遺伝子を利用することにより、微生物によってコエンザイムQ₁₀を効率よく生産する方法を提供する。本発明は、

塩基配列が配列番号1に記載のものであるDNA、

配列番号1に示す塩基配列において1若しくは複数の塩基が欠失、追加、挿入及び／又は置換された塩基配列を有し、かつデカブレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA、又は

配列番号1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつデカブレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

明細書

コエンザイムQ₁₀の製造法

技術分野

5 本発明は、医薬品等として用いられているコエンザイムQ₁₀の製造に関する。さらに詳細には、コエンザイムQ₁₀の生合成に関するキー酵素であるコエンザイムQ₁₀側鎖合成酵素、すなわちデカブレニル2磷酸合成酵素をコードする遺伝子をSaitoellia属に属する真菌より単離し、これを微生物に導入することによりコエンザイムQ₁₀を生成させる方法に関する。

10

背景技術

従来のコエンザイムQ₁₀の製造法は、タバコなどの植物由来のコエンザイムを単離してその側鎖長を合成法により調整する等によって工業的には生産されている。

15 また、コエンザイムQ₁₀は細菌や酵母などの微生物から高等動植物に至るきわめて幅広い生物により生産されることが知られているが、微生物を培養してその菌体より本物質を抽出する方法が最も有効な一つの製造法であると考えられ、実際の工業的な生産にも用いられている。しかしながら、これらの方法では、生成量が少なかつたり、操作が煩雑であつたりして、生産性が良くなかった。

20 コエンザイムQ₁₀の生物による生合成経路については、原核生物と真核生物では一部異なっているが、いずれも多くの酵素が関与した多段階の複雑な反応によって生成されている。しかし、基本的には大きく3つのステップ、すなわち、コエンザイムQ₁₀のブレニル側鎖のもとになるデカブレニル2磷酸を合成するステップ、キノン環のもとになるパラヒドロキシ安息香酸を合成するステップ、
25 そして、これらの2つの化合物を結合させて置換基を順次変換してコエンザイムQ₁₀を完成させるステップよりなっている。これらの反応の中で、生合成反応全体の律速であると言われ、コエンザイムQ₁₀の側鎖の長さを決定している反応、すなわちデカブレニル2磷酸合成酵素の反応は最も重要な反応であると考えられる。そこで、コエンザイムQ₁₀を効率よく生産させる為には、生合成に関

与するキー遺伝子、デカブレニル2リン酸合成酵素の遺伝子を単離して生産増強に利用することが有効であると考えられるが、その遺伝子源としてはコエンザイムQ₁₀を比較的多量に生産している真菌類が有力な候補となる。

これまでにデカブレニル2リン酸合成酵素の遺伝子としては、Schizosaccharomyces pombe (特開平9-173076) やGlucconobacter suboxydans (特開平10-57072) などいくつかの種類の微生物より分離されているが、本来これらの微生物ではコエンザイムQ₁₀の生産性が十分とはいえず、これらの微生物では効率的な培養や分離精製などは出来ていなかった。そこで、さらにコエンザイムQ₁₀を高生産する微生物由来の本酵素遺伝子を単離することが望まれていた。

本発明は、上記の生産に関する問題を解決するべく、Saitoellia属に属する真菌由来のコエンザイムQ₁₀の側鎖合成遺伝子を単離してこれを利用することにより、微生物によってコエンザイムQ₁₀を効率よく生産することを目的とする。

15

発明の開示

上記目的を達成する為に、本発明では、まず、Saitoellia属に属する真菌よりコエンザイムQ₁₀の生合成に関与するキー遺伝子、デカブレニル2リン酸合成酵素の遺伝子を単離した。そして、該遺伝子を大腸菌などの微生物に導入して発現させることにより、コエンザイムQ₁₀を効率よく生産させることが可能となった。

本発明者らは、コエンザイムQ₁₀を比較的多量に生産しているSaitoellia属に属する真菌からデカブレニル2リン酸合成酵素遺伝子を分離するための検討を重ね、該遺伝子を分離することに成功した。

25 即ち本発明は、以下の(a)、(b)又は(c)のDNAである：

(a) 塩基配列が配列番号1に記載のものであるDNA：

(b) 配列番号1に示す塩基配列において1若しくは複数の塩基が消失、追加、挿入及び／又は置換された塩基配列を有し、かつデカブレニル2リン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA：

(c) 配列番号1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつデカブレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

本発明はまた、以下の(d)又は(e)のタンパク質である：

5 (d) アミノ酸配列が配列番号2に記載のものであるタンパク質；

(e) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、追加、挿入及び／又は置換されたアミノ酸配列からなり、かつデカブレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質。さらに、このタンパク質をコードするDNAでもある。

10 さらに本発明は、上記DNAを含有する発現ベクターである。本発明の発現ベクターは、従来知られているベクター系いずれを用いても良いことから、本発明は、例えば発現用ベクターpUCNTへ配列番号1の配列を有するDNAを導入してなる、pNTSa1である。

本発明は、宿主微生物を上記DNAにて形質転換してなる形質転換体もある。

15 本発明の宿主微生物としては、Escherichia coliが好適に用いられる。

本発明はさらに、上記形質転換体を培地中で培養することにより培養物中にコエンザイムQ₁₀を生成蓄積し、これを採取する工程からなるコエンザイムQ₁₀の製造方法である。本発明の方法において用いる、宿主微生物としては特に限定されないが、Escherichia coliが好適に用いられる。Escherichia coliの產生するコエンザイムQは、コエンザイムQ₈であるが、本発明の方法によって、コエンザイムQ₁₀を產生させることが可能となつた。

25 本発明者らは、コエンザイムQ₁₀を比較的多量に生産しているSaitoellal属に属する真菌から本酵素遺伝子を分離するための検討を重ねたところ、PCR法によって該遺伝子の断片を取得することに成功した。

既知のデカブレニル2磷酸合成酵素、及び本酵素と類縁で鎖長の違うコエンザイムQの長鎖ブレニル鎖合成酵素であるポリブレニル2磷酸合成酵素の遺伝子の配列を比較し、その相同性の高い領域についてPCRプライマーを各種合成した。

そしてこれらのプライマーを種々組み合わせ、PCRの条件をいろいろ検討したところ、プライマーDPS-1 (5' - AAGGATCCTNYTNCAYGAYGTYGAYGT-3') 及びDPS-1 1AS (5' - ARYTGNAADRAAYTCNCC-3') を用い(なお、ここで示した配列中の、RはAまたはG、5 YはCまたはT、そしてNはG、A、TまたはCを示す。)、PCRを94°C、3分間の熱処理の後、94°C、1分→43°C、2分→72°C、2分のサイクルを40回繰り返すことにより、Saitoellia属に属する真菌、Saitoellia complicata IFO 10748の染色体遺伝子から本酵素遺伝子の約220bpの断片が増幅してくることを、その遺伝子の塩基配列を解析することにより明らかにした。

そこで次に本酵素遺伝子の全長を取得するためには、Saitoellia complicata IFO 10748の染色体遺伝子を制限酵素EcoRIで切断し、ラムダファージベクターに挿入して組換えファージライブラリーを作製する。そのplaquesをナイロン膜に転写した後、標識した該PCR断片を用いてplaquesハイブリダイゼーションを行えば、デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子全長を持つクローンを取得することができる。

得られたクローンに含まれるデカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子について塩基配列の決定を行ったところ、配列表の配列番号1に示した塩基配列を持つことが明らかとなった。この塩基配列から予想されるアミノ酸配列が配列表の配列番号2に示したものであり、ここにはデカプレニル2磷酸合成酵素の遺伝子として特徴的な配列がみられる。

本発明のDNAは、塩基配列が配列番号1に記載のものであるDNAであってもよいし、配列番号1に示す塩基配列において1若しくは複数の塩基が欠失、追加、挿入及び/又は置換された塩基配列を有し、かつデカプレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよいし、また、配列番号1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつデカプレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

「1若しくは複数の塩基が欠失、追加、挿入及び/又は置換された塩基配列」

とは、蛋白核酸酵素 増刊 遺伝子増幅PCR法 TAKKAJ 35(17),
 2951-3178(1990)又はHenry A. Erlich編 加藤郁
 之進監訳 PCRテクノロジー(1990)などに記載の当業者に周知の方法に
 より欠失、追加、挿入及び／又は置換できる程度の数の塩基が欠失、追加、挿入
 5 及び／又は置換されてなる塩基配列を意味する。

本明細書中、「デカプレニル2リン酸合成酵素活性を有するタンパク質」とは、
 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を用いた場合の10%以上、
 好ましくは40%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以
 上の収率でデカプレニル2リン酸を合成する能力を持つタンパク質のことをいう。
 10 このような測定は、FPP(ファルネシル2リン酸)と¹⁴C-I PP(放射ラ
 ベルしたイソペンテニル2リン酸)を用いて対象酵素と反応させ、生成した¹⁴
 C-DPP(デカプレニル2リン酸)をホスファターゼにより加水分解後、TL
 Cにて分離して、各鎖長のスポットへの取り込みによって確定する(Okada
 et al., Eur. J. Biochem., 255, 52-59)。

15 「配列番号1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハ
 イブリダイズするDNA」とは、配列番号1に示す塩基配列からなるDNAをプ
 ローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイ
 ゼーション法、又はサザン・ハイブリダイゼーション法などを用いることにより
 得られるDNAのことをいう。当業者であれば、該ハイブリダイゼーションをM
 20 o le c u l a r C l o n i n g 2 n d E d t. (C o l d S p r i n
 g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, 1989)に記載され
 ている方法に準じて実施して、目的とするDNAを容易に取得できる。

本発明のタンパク質は、アミノ酸配列が配列番号2に記載のものであるタンパ
 ク質であってもよいし、配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは複数
 25 のアミノ酸が欠失、追加、挿入及び／又は置換されたアミノ酸配列からなり、か
 つデカプレニル2リン酸合成酵素活性を有するタンパク質であってもよい。

「1若しくは複数のアミノ酸が欠失、追加、挿入及び／又は置換されたアミノ
 酸配列」は、部分特異的突然変異誘発法など当業者に周知の方法によりアミノ酸
 を欠失、追加、挿入及び／又は置換することにより取得可能である。具体的には、

Nucleic Acid Res. 10, 6487 (1982)、Methods in Enzymology 100, 448 (1983) 等の文献に記載されている。

本発明のタンパク質は、配列番号2に示すアミノ酸配列と60%以上、好み5くは70%以上、より好みしくは80%以上、さらに好みしくは90%以上、特に好みしくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるものが好適である。

「相同性」は、対比する2つの塩基配列を最適に整列させた後、塩基(A, T, C, G, U又はI)が両方の配列で適合した位置の数を適合位置数とし、これを10比較塩基総数で除して、そして、この結果に100を乗することにより算出する。具体的には、日立ソフトエンジニアリング製のDNASIS、ソフトウェア開発のGENETYX、又は、Finland CSCのClustal Xといった解析ソフトを用いて算出することができる。

デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子を発現させるためには、適当なプロモーターの下流に該遺伝子を接続することが必要であるが、例えば遺伝子を含むDNA断片を制限酵素によって切り出したり、PCRによって酵素をコードする遺伝子部分のみを增幅させたりした後、プロモーターを持つベクターに挿入することにより発現ベクターとすることができる。本発明において、デカプレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを組み込む発現用ベクターとしては特に限定されず、例えば、大腸菌由来のプラスミドに、適当なプロモーターを組み込んだものが挙げられる。大腸菌由来のプラスミドとしては、例えば、pBR322、pBR325、pUC19、pUC119等が挙げられ、プロモーターとしては、例えば、T7プロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター、λPLプロモーター等が挙げられる。また、本発明においては発現用ベクターとして、pGEX-2T、pGEX-3T、pGEX-3X(以上、ファルマシア社製)、pBlue script・、pUC19(東洋紡社製)、pMALC2、pET-3T、pUCNT(WO94/03613に記載)等を用いることもできる。このうち、pUCNTが好適に用いられ、具体的な例としては、発現用ベクター pUCNT に配列番号1に示すDNA

配列を有する遺伝子を挿入すれば、デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子の発現ベクター、pNTSa1を作製することができる。

そして、該酵素遺伝子の発現ベクターを適当な微生物に導入することによりコエンザイムQ₁₀の生産に利用することが可能となる。宿主微生物としては特に5 限定されず、Escherichia coliが好適に用いられる。Escherichia coliとしては特に限定されず、XL1-Blue、BL-21、JM109、NM522、DH5α、HB101、DH5等が挙げられる。このうちEscherichia coli DH5αが好適に用いられ、例えば、デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子の発現ベクター、pNTSa1を大腸菌10 に導入した場合には、大腸菌が本来は生産しないコエンザイムQ₁₀を、著量生産するように変換できる。この大腸菌菌株E. coli DH5α (pNTSa1) は通商産業省、工業技術院、生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6844として寄託されている。

また、宿主微生物として川向らが作製したオクタプレニル2リン酸合成酵素遺15 伝子破壊大腸菌菌株Escherichia coli KO229 (Journal of Bacteriology、1997年、第179巻、3058-3060頁) はコエンザイムQ₈が生産できないため、これを宿主として用いることによりさらにコエンザイムQ₁₀を高生産する事ができる。

本遺伝子は単独で用いるほか、他の生合成に関与する遺伝子と同時に微生物に20 導入して発現させることにより、さらに良い効果が期待できる。

本発明で得られた形質転換体を、常法に従い、培養し、培養物中からコエンザイムQ₁₀を採取することにより、コエンザイムQ₁₀を製造することができる。宿主微生物がEscherichia coliである場合は、培地として、LB培地や、グルコースやカザミノ酸を含むM9培地を用いることができる。プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、イソプロピルチオガラクトシドや25 インドリル-3-アクリル酸のような薬剤を培地に加えてもよい。培養は例えば、37°Cで17~24時間行い、この際必要により通気や攪拌を行ってもよい。本発明において、得られたコエンザイムQ₁₀は精製を行ってもよく、粗精製物として用いてもよく、用途により適宜選択することができる。得られた培養物から

コエンザイムQ₁₀を単離するには公知の分離・精製法を適宜組み合わせることができる。公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿等の溶解度を利用する方法、透析法、限外濾過法、ゲル濾過法、及び、(SDS-)ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

本発明において得られたコエンザイムQ₁₀の用途は特に限定されず、医薬品等に好適に用いることができる。

図面の簡単な説明

図1は、デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子を持つプラスミド、pNTS a 1の制限酵素地図を示す。

図2は、デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌DH5αにおいて、生産されたコエンザイムQ₁₀を高速液体クロマトグラフィーによって検出したチャートを示す。

図3は、デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌KO229において、生産されたコエンザイムQ₁₀を高速液体クロマトグラフィーによって検出したチャートを示す。

発明を実施するための最良の形態

(実施例1)

Saitoell a complicata IFO 10748の染色体DNAをC. S. Hoffmannらの方法(Gene, 57 (1987) 267-272)で調製した。既知の長鎖プレニル2磷酸合成酵素の遺伝子との相同性からPCRに用いるプライマーDPS-1 (5' -AAGGATCCTNYTNCAYGAYGAYGT-3') 及びDPS-1 1AS (5' -ARYTGNA DRAAYTCNCC-3') を設計した。なお、ここで示した配列中の、Rは

AまたはG、YはCまたはT、そしてNはG、A、TまたはCを示す。これらを用いてPCRを94°C、3分間の熱処理の後、94°C、1分→43°C、2分→72°C、2分のサイクルを40回繰り返すことにより行い、1. 2%アガロースゲル電気泳動により分析した。

5 そして得られた約220bpの断片をゲルより切り出してDNA抽出キット（Sephaglass（商標）Brand Prep Kit、アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて精製した後、PCR産物ダイレクトクローニングキット（pT7Blue T-Vector Kit、NOVAGEN社製）を用いて大腸菌発現用ベクターにクローニングし、pT7-SaDPSを得た。D
10 11 NA塩基配列をDNAシークエンサー（377型、パーキンエルマー社製）を用い、DNAシークエンスキット（パーキンエルマー社製、ABI PRISM（商標）Big Dye（商標）Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit With AmpliTaq（登録商標）DNA polymerase、FS）を使用して、その取り扱い説明書に従って反応を行い配列を決定した。その結果、配列表の配列番号1
15 の717から924までの塩基配列に示す配列が得られた。この翻訳配列に長鎖プレニル鎖を持つプレニル2磷酸合成酵素に特徴的な領域の配列「GDFLLGRA」が見出せたことにより、得られた配列はデカプレニル2磷酸合成酵素の遺伝子の一部であることが想定された。

20

(実施例2)

Saitoellacomplicata IFO 10748のデカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子と思われる220bpのDNA断片を持つpT7-SaDPSベクターDNA 0.03μgを用い、PCR用のプライマーSa-1S（5'-GAGACCAGACGAAACGCCACCA-3'の配列を持つ）及びSa-2AS（5'-TGGTGCGTTTCGTCTGGTCTC-3'の配列を持つ）を用いてPCR（94°C、3分→（94°C、30秒→55°C、30秒→72°C、1分）×25サイクル繰り返し→72°C、5分→4°C）を行い、1. 2%アガロース（宝酒造製）によるゲル電気泳動を行い、約145bpの断

片をゲルより切り出してDNA抽出キット (Sephaglass (商標) Brand Prep Kit、アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いて精製した。このDNA断片約100ngを用い、ECLダイレクト核酸ラベリングシステム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いて化学発光標識した。

5

(実施例3)

Saitoella complicata IFO 10748の染色体DNAを制限酵素EcoRIで切断し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。このゲルをアルカリ (0.5M NaOH、1.5M NaCl) で10変成させ、中和 (0.5M Tris·HCl (pH 7.5)、1.5M NaCl) した後、ハイボンドN+フィルター (アマシャム社製) をゲルに重ね、20×SSCを用いて一晩、サザントランスファーさせた。そのフィルターを乾燥し、80°Cで2時間焼付けを行った後、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) でサザンハイブリダイゼーションと検出を行った。すなわち、ゴールドハイブリダイゼーション液 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いて42°C、1時間プレハイブリダイズした。

化学発光標識したプローブを95°Cで5分間加熱後、氷中で急冷し、プレハイブリダイズ処理したフィルターのプレハイブリダイズ液に添加し、42°Cで22時間ハイブリダイズさせた。このフィルターを6M尿素、0.4%SDSを含む0.5×SSC溶液を用いて42°Cで20分2回洗浄後、2×SSC溶液を用い室温で5分2回洗浄した。このフィルターをエンハンスドケミルネセンス試薬 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) に浸した後、X線フィルムに密着させて感光させ、黒く感光したバンドを検出した。
25 その結果、制限酵素EcoRIで切断した約10kbpの断片に強くハイブリダイズしていた。

(実施例4)

Saitoella complicata IFO 10748の染色体D

NAを制限酵素E c o R Iで切断し、0. 8%アガロースによるゲル電気泳動を行い、約10 k b p付近のDNA断片をゲルより切り出して精製することにより、
5 クローン化に用いるDNA断片を調製した。このDNA断片をλ-DASHII
ファージキット（ストラテジーン社製）を用いてそのファージのE c o R I サイ
トに組み込み、インビトロパッケージングキット（アマシャム社製）でパッケー
ジングを行った。そして、大腸菌XL1-Blue MRA (P2) に感染させてNZY平板培地 (5 g/L NaCl, 2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5
10 g/L 酵母エキス、10 g/L NZアミン、18 g/L 寒天 (pH 7.5)) 上にNZY軟寒天培地 (NZY平板培地の寒天のみ8 g/L) とともに重層
してブラークとした。これをハイボンドN+フィルター（アマシャム社製）にト
ランスファーしアルカリ (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) で変成した後、中和 (0.5M Tris · HCl (pH 7.5), 1.5M NaCl)
15) 、乾燥し、80°Cで2時間焼付けを行った。

焼き付け後のフィルター9枚を用い、実施例3と同様にプレハイブリダイゼー
15 ション、化学発光標識したプローブを用いたハイブリダイゼーションを行い、こ
のフィルターを洗浄した。このフィルターを乾燥後、X線フィルムに密着させて
感光させ、黒く感光したスポットに対応するファージのブラークを分離した。こ
の分離したブラークのファージを上記と同様の方法で大腸菌に感染させてブラー
クとし、フィルターに写して再びハイブリダイゼーションを行い、確認を行った
20 ところ、6株のファージが選択できた。

このファージの懸濁液を用い、上記のSa-1S及びSa-2ASを用いPCRを行ったところ、6株に145 b pのDNA断片が検出できた。そこで組み換えλ-DASHII ファージ粒子からラボマニュアル遺伝子工学（村松正實編、
丸善株式会社、1990年）に従って、ファージDNAを調製した。調製したフ
25 アージDNAを、サブクローニングするため、制限酵素S a 1 I、S a c Iで切
断し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。このゲルをアルカリ
(0.5M NaOH, 1.5M NaCl) で変成させ、中和 (0.5M Tris · HCl (pH 7.5), 1.5M NaCl) した後、ハイボンドN+
フィルター（アマシャム社製）をゲルに重ね、20×SSCを用いて一晩、サザ

ントランスファーさせた。そのフィルターを乾燥し、80°Cで2時間焼付けを行った後、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）でサザンハイブリダイゼーションと検出を行った。すなわち、ゴールドハイブリダイゼーション液（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて42°C、1時間プレハイブリダイズした。

5 化学発光標識したプローブを95°Cで5分間加熱後、氷中で急冷し、プレハイブリダイズ処理したフィルターのプレハイブリダイズ液に添加し、42°Cで22時間ハイブリダイズさせた。このフィルターを6M尿素、0.4%SDSを含む0.5×SSC溶液を用いで42°Cで20分2回洗浄後、2×SSC溶液を用い10 室温で5分2回洗浄した。このフィルターをエンハンスドケミルネセンス試薬（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に浸した後、X線フィルムに密着させて感光させ、黒く感光したバンドを検出した。

15 その結果、制限酵素Sal Iで切断した約4.5kbとSac Iで切断した約3.5kbの断片に強くハイブリダイズしていた。ファージDNAを、制限酵素Sal I、Sac Iで切断し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。そして黒く感光したバンドに相当する位置の大きさの制限酵素消化断片をゲルより切り出してDNA抽出キット（Sephaglass（商標）Brand Prep Kit、アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて精製した後、DNA塩基配列をDNAシークエンサー（377型、パーキンエルマー社製）を用い、DNAシークエンスキット（パーキンエルマー社製、ABI PRISM（商標）BigDye（商標）Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit With Amp t iTaq（登録商標）DNA polymerase、FS）を使用して、その取り扱い説明書に従って反応を行い配列を決定した。

25 その結果、配列表の配列番号1の1124にSal Iサイトが、1241にSac Iサイトが存在することが判り、C末端までを両断片とも含まなかつたので、2つの制限酵素のうち、デカブレニル2'磷酸合成酵素遺伝子の中の前の方に存在しているSal Iについて残りの制限断片を調べたところ3kb pの断片に、Sac I断片の終わりの部分を含む終止コドンまでを含んでいた。これら3つの制

限酵素断片を解析することによりデカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子の全配列を明らかにすることことができた。3つのDNA断片のうちの、約1. 6 k b pのDNAについてその塩基配列を決定したが、その結果を配列表の配列番号1に示す。また、このDNA配列から予測されるアミノ酸配列を配列番号2に示した。

5 得られた配列を、Journal of Biological Chemistry、1990年、第265巻、13157-13164頁に記載のSaccharomyces cerevisiaeのデカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子と比較したところ、日立ソフトエンジニアリング製のDNASISという解析ソフトにより、アミノ酸配列では約48%の相同性を有していた。また、特開10 平9-173076に記載のSchizosaccharomyces pombe由来のデカプレニル2磷酸合成酵素と比較したところ、同じくDNASISにより、アミノ酸では49%の相同性を有していた。

(実施例5)

15 調製したファージDNAよりデカプレニル2磷酸合成酵素をコードする遺伝子部分のみを切り出す為、合成DNAプライマーSa-N1 (5' - AACATA TGGCCTCACCAAGCACTGCGG - 3' の配列を持つ) 及びSa-C (5' - AAGAATTCCCTATCTTGACCTAGTCACAC - 3' の配列を持つ) を用いて実施例3と同様にPCRを行い、制限酵素Nde I及び20 Eco RIで切断した後、発現用ベクターpUCNT (WO 94/03613に記載) に挿入してデカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子の発現ベクター、pNTSa1を作製した。得られた発現ベクター、pNTSa1の制限酵素地図を図1に示す。なお、DPSとは、デカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子のコード領域を意味する。

25

(実施例6)

作製したデカプレニル2磷酸合成酵素遺伝子の発現ベクターpNTSa1を大腸菌DH5 α に導入し、10mLのLB培地で37°C、一晩振とう培養し、菌を遠心分離(3000回転、20分間)で集めた。

この菌体を 1 mL の 3 % 硫酸水溶液に懸濁し、120°C、30 分間熱処理後、
2 mL の 14 % 水酸化ナトリウム水溶液を添加して更に 120°C、15 分間熱処理した。この処理液に 3 mL のヘキサン・イソプロパノール (10 : 2) を添加して抽出し、遠心分離の後、その有機溶媒層 1. 5 mL を分離し、減圧条件で溶媒を蒸発させて乾固した。これを 200 μL のエタノールに溶解し、その 20 μL を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製、LC-10A) により分析した。分離には逆相カラム (YMC-pack ODS-A、250 × 4.6 mm, S-5 μm, 120 A) を用い、エタノール・メタノール (2 : 1) を移動相の溶媒として使用して分離させ、275 nm の波長の吸光度で生成したコエンザイム Q₁₀ を検出した。結果を図 2 に示した。図 2 に示すように、デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を導入して発現させることによって、組換え大腸菌では、大腸菌が本来生産しないコエンザイム Q₁₀ を、生産するようになったことが分かった。

得られた組換え大腸菌株 E. coli DH5α (pNT Sa1) は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に平成 11 年 8 月 17 日に寄託した (受託番号 FERM BP-6844)。

(実施例 7)

川向らが作製したオクタプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子破壊大腸菌菌株 E s cherichia coli KO229 は、該遺伝子がスペクチノマイシン耐性プラスミド上 (pKA3) に保持された状態で維持され、該プラスミドが脱落すると致死になることが判っている (Journal of Bacteriology 1997 年、第 179 卷、3058-3060 頁)。この破壊株に pNTSa1 を導入するため、KO229 に pNTSa1 を導入後、アンピシリンを含む 10 mL の LB 培地で 37°C、一晩振とう培養し、その 1 % を新たなアンピシリンを含む 10 mL の LB 培地に継植後、さらに 37°C、一晩振とう培養する事を 9 回繰り返した後、アンピシリンを含む LB プレート培地で生育し、スペクチノマイシンを含む LB プレート培地で生育し無い株を選択した。

(実施例 8)

実施例 7 で作製した p N T S a 1 を導入した K O 2 2 9 株を 1 0 m L の LB 培地で 3 7 °C、一晩振とう培養し、菌を遠心分離（3 0 0 0 回転、2 0 分間）で集めた。

この菌体を 1 m L の 3 % 硫酸水溶液に懸濁し、1 2 0 °C、3 0 分間熱処理後、2 m L の 1 4 % 水酸化ナトリウム水溶液を添加して更に 1 2 0 °C、1 5 分間熱処理した。この処理液に 3 m L のヘキサン・イソプロパノール（1 0 : 2）を添加して抽出し、遠心分離の後、その有機溶媒層 1. 5 m L を分離し、減圧条件で溶媒を蒸発させて乾固した。これを 2 0 0 μ L のエタノールに溶解し、その 2 0 μ L を高速液体クロマトグラフィー（島津製作所製、LC-10 A）により分析した。分離には逆相カラム（YMC-p a c k O D S-A、2 5 0 × 4. 6 mm、S - 5 μ m、1 2 0 A）を用い、エタノール・メタノール（2 : 1）を移動相の溶媒として使用して分離させ、2 7 5 n m の波長の吸光度で生成したコエンザイム Q₁₀ を検出した。結果を図 3 に示した。図 3 に示すように、デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を導入して発現させることによって、大腸菌が本来生産しないコエンザイム Q₁₀ を、生産するようになり、また、コエンザイム Q₈ を生産できる大腸菌に比べてコエンザイム Q₁₀ を、著量生産するように変換できた。

産業上の利用の可能性

コエンザイム Q₁₀ の生合成に関するキー酵素、デカプレニル 2 磷酸合成酵素をコードする遺伝子を S a i t o e l l a 属の真菌より単離し、配列決定を行った。また、これを大腸菌に導入して発現させることに成功した。本発明の方法を用いることにより医薬品等として用いられているコエンザイム Q₁₀ を効率的に製造することができる。

請求の範囲

1. 以下の (a)、(b) 又は (c) のDNA:

(a) 塩基配列が配列番号1に記載のものであるDNA:

5 (b) 配列番号1に示す塩基配列において1若しくは複数の塩基が欠失、追加、挿入及び／又は置換された塩基配列を有し、かつデカプレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA:

(c) 配列番号1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつデカプレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質を
10 コードするDNA。

2. 以下の (d) 又は (e) のタンパク質:

(d) アミノ酸配列が配列番号2に記載のものであるタンパク質:

15 (e) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、追加、挿入及び／又は置換されたアミノ酸配列からなり、かつデカプレニル2磷酸合成酵素活性を有するタンパク質。

3. 請求項2記載のタンパク質をコードするDNA。

20 4. 発現用ベクターに請求項1又は3記載のDNAを組み込んでなる発現ベクター。

5. 発現用ベクターは、pUCNTである請求項4記載の発現ベクター。

25 6. 発現ベクターは、pNTSa1である請求項5記載の発現ベクター。

7. 宿主微生物を請求項1又は3記載のDNAにて形質転換してなる形質転換体。

8. 宿主微生物を請求項4、5又は6記載の発現ベクターにて形質転換してなる形質転換体。

9. 宿主微生物は、Escherichia coliである請求項7又は8
5 記載の形質転換体。

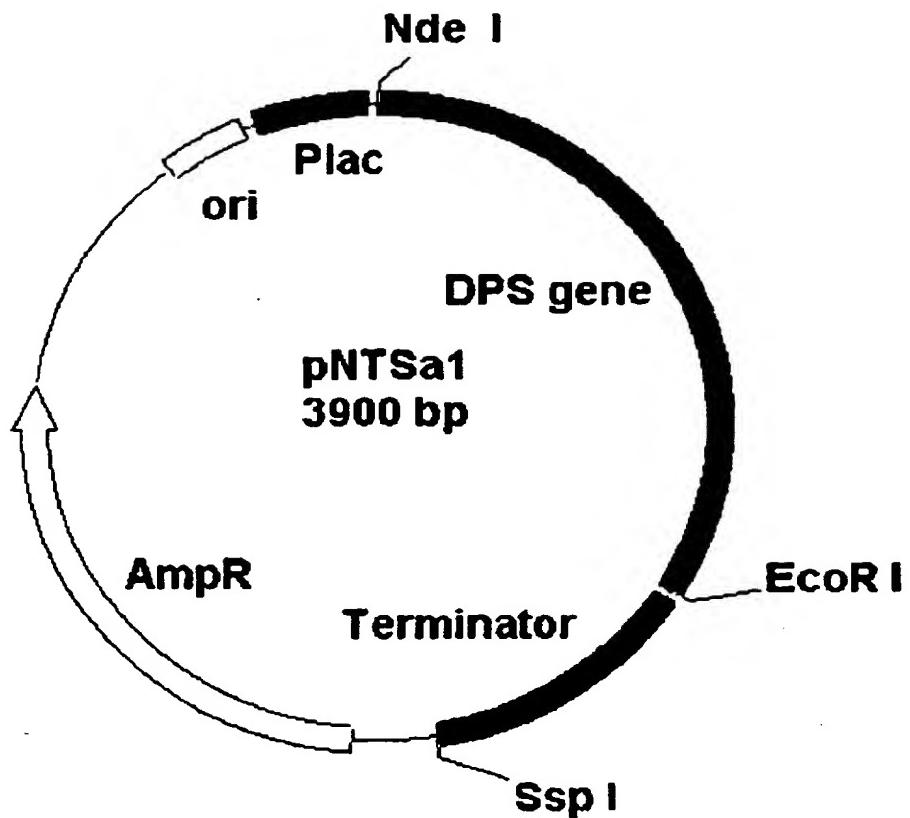
10. Escherichia coliは、Escherichia coli DH5 α である請求項9記載の形質転換体。

10 11. 形質転換体は、E. coli DH5 α (pNT Sa1) (FERM
BP-6844)である請求項10記載の形質転換体。

12. 請求項7、8、9、10又は11記載の形質転換体を培地中で培養することにより培養物中にコエンザイムQ₁₀を生成蓄積し、これを採取する工程からなるコエンザイムQ₁₀の製造方法。
15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

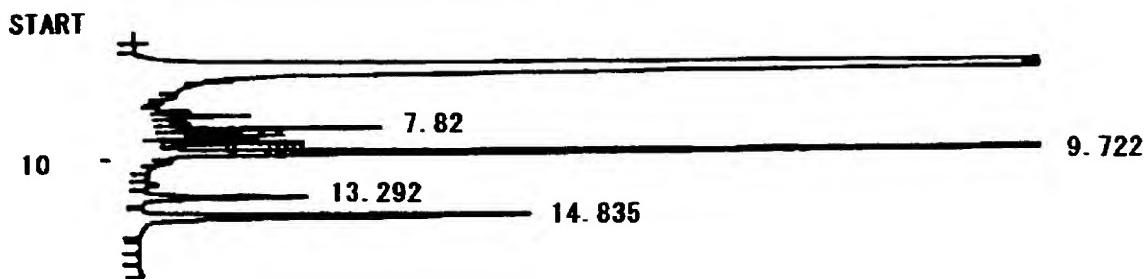
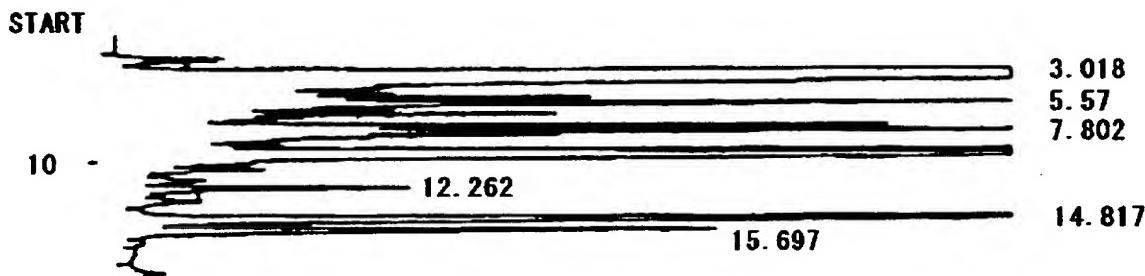
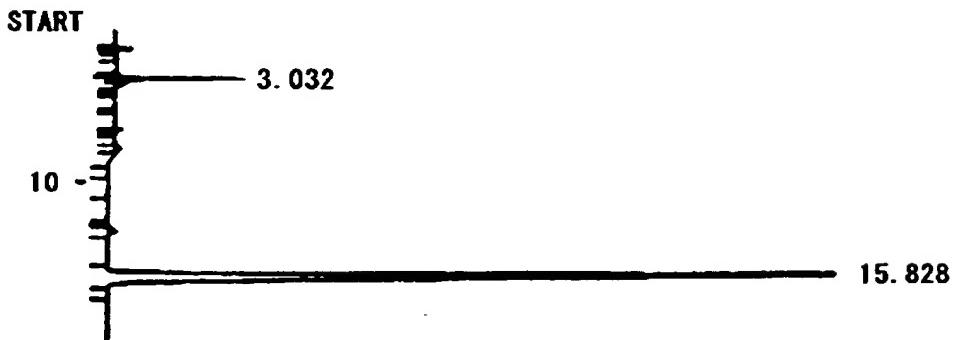
図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/3

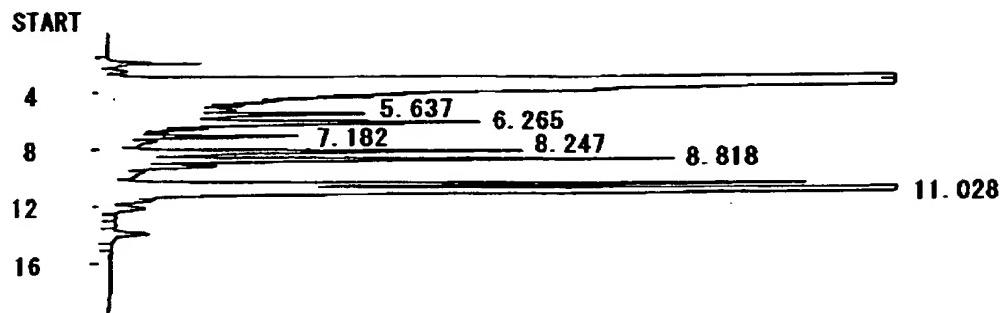
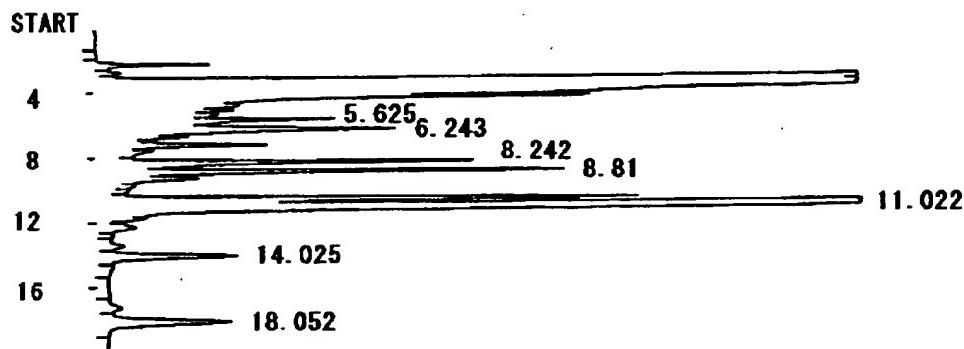
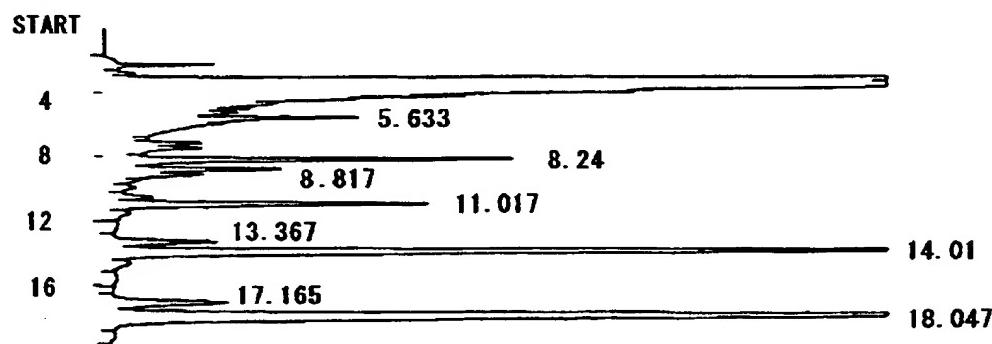
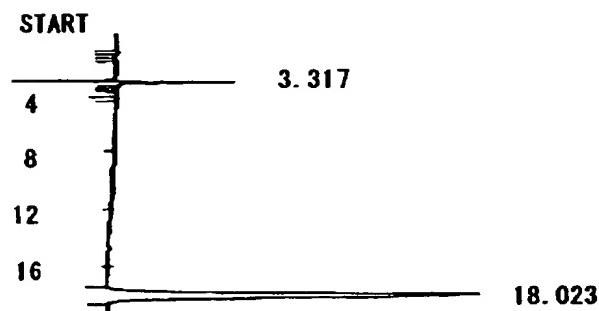
図 2

E. Coli DH5 α **E. Coli DH5 α / pNTSa1****CoQ₁₀ Standard**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/3

図 3

E. Coli K0229 / pKA3**E. Coli K0229 / pKA3 + pNTSa1****E. Coli K0229 / pNTSa1****CoQ₁₀ Standard**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1

配列表

Sequence listing

<110> 鎌淵化学工業株式会社 Kaneka Corporation

5

<120> コエンザイムQ₁₀の製造法

<130> T549/QX-GT2

10 <150> JP P1999-237561

<151> 1999-08-24

<160> 2

15 <210> 1

<211> 1653

<212> DNA

<213> Saioella complicata

20 <400> 1

tttgtggg tcgaaaagtc ggcacgggtg cagggtcgcc ttgagaccag taaaggctcg 60

gagattgagt tcaggacaaa gccttgcattcc gtgaggtcta catcttcagc aaatcatttc 120

25 aaatccatat acc atg gcc tca cca gca ctg cggttata cga agc atc agc 169

Met Ala Ser Pro Ala Leu Arg Ile Arg Ser Ile Ser

1

5

10

tct cga tca atc gcc tct ctg cga tcg gtt acc cta aga aca gcc tcg 217

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Arg Ser Ile Ala Ser Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Thr Ala Ser

15

20

25

gca cct tca tta cga cta aga tgt acc ccg acg agc cg^g cca tcg agt 265

5 Ala Pro Ser Leu Arg Leu Arg Cys Thr Pro Thr Ser Arg Pro Ser Ser

30

35

40

tca tgg gct gct gtg tct tcg gc^g tcg aga ctg gtt gag cct gat 313

Ser Trp Ala Ala Ala Val Ser Ser Ala Ser Arg Leu Val Glu Pro Asp

10 45

50

55

60

ccg aat caa cct ctc atc aat ccg ctc aac ttg gtc ggt ccc gag atg 361

Pro Asn Gln Pro Leu Ile Asn Pro Leu Asn Leu Val Gly Pro Glu Met

65

70

75

15

tca aat ctt aca tcc aac atc cga tct ctc ggt tca gga cac cct 409

Ser Asn Leu Thr Ser Asn Ile Arg Ser Leu Leu Gly Ser Gly His Pro

80

85

90

20 tct ctc gac act gtc gct aaa tac tat gtt cag tct gag gga aag cat 457

Ser Leu Asp Thr Val Ala Lys Tyr Tyr Val Gln Ser Glu Gly Lys His

95

100

105

att cgt ccg ctc atg gta ctg ctg atg gct cag gc^g acg gag gtt gc^g 505

25 Ile Arg Pro Leu Met Val Leu Leu Met Ala Gln Ala Thr Glu Val Ala

110

115

120

cca aaa gtt cag ggt tgg gag aag gtc gtg gag gtt ccg gtg aac gag 553

Pro Lys Val Gln Gly Trp Glu Lys Val Val Glu Val Pro Val Asn Glu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

125 130 135 140

gga ctc gca cca cca gag gtg ctc aat gac aag aac cca gat atg atg 601
Gly Leu Ala Pro Pro Glu Val Leu Asn Asp Lys Asn Pro Asp Met Met

5 145 150 155

aac atg agg tca gga cca tta acg aag gac ggc gag atc gag gga cag 649
Asn Met Arg Ser Gly Pro Leu Thr Lys Asp Gly Glu Ile Glu Gly Gln

160 165 170

10 175 180 185
acg tcg aat atc ctc gcc tcg caa cgg cgg ttg gct gag atc acg gag 697
Thr Ser Asn Ile Leu Ala Ser Gln Arg Arg Leu Ala Glu Ile Thr Glu

15 190 195 200 745
atg atc cat gca gca tca ctc ctc cac gac gac gtt atc gac gct tcc
Met Ile His Ala Ala Ser Leu Leu His Asp Asp Val Ile Asp Ala Ser

20 205 210 215 220 793
gag acc aga cga aac gca cca tcc gga aac cag gca ttc gga aac aag
Glu Thr Arg Arg Asn Ala Pro Ser Gly Asn Gln Ala Phe Gly Asn Lys

25 225 230 235 841
atg gcg att ttg gct ggt gat ttc ttg ttg gga cgg gcg tct gtt gca
Met Ala Ile Leu Ala Gly Asp Phe Leu Leu Gly Arg Ala Ser Val Ala

ttg gcg agg ttg cgc aat ccg gag gtg att gag ctt ttg gct act gtt 889
Leu Ala Arg Leu Arg Asn Pro Glu Val Ile Glu Leu Leu Ala Thr Val

240 245 250

THIS PAGE BLANK (USPTO)

att gca aac ttg gtt gag gga gag ttc atg cag ttg aaa aat act gtt 937
Ile Ala Asn Leu Val Glu Gly Glu Met Gln Leu Lys Asn Thr Val
255 260 265

5
gat gat gcg att gag gct acg gcg acg cag gaa acg ttc gat tac tat 985
Asp Asp Ala Ile Glu Ala Thr Ala Thr Gln Glu Thr Phe Asp Tyr Tyr
270 275 280

10 ttg cag aag act tac ttg aag act gcg tcc ttg att gcc aag tcg tgc 1033
Leu Gln Lys Thr Tyr Leu Lys Thr Ala Ser Leu Ile Ala Lys Ser Cys
285 290 295 300

aga gca agt gcg ctt ctg ggt ggt gct acg cct gag gtt gct gat gct 1081
15 Arg Ala Ser Ala Leu Leu Gly Gly Ala Thr Pro Glu Val Ala Asp Ala
305 310 315

gct tat gct tac gga agg aac ctt ggt ttg gca ttc cag atc gtc gac 1129
Ala Tyr Ala Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe Gln Ile Val Asp
20 320 325 330

gac atg ctc gac tac acc gtc tcc gct acc gac ctc ggt aag ccc gcc 1177
Asp Met Leu Asp Tyr Thr Val Ser Ala Thr Asp Leu Gly Lys Pro Ala
335 340 345

25 ggt gca gac ctc cag ctc ggt ctc gcc acc gcg ccg gcc ctc ttc gca 1225
Gly Ala Asp Leu Gln Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro Ala Leu Phe Ala
350 355 360

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tgg aag cac cac gcc gag ctc ggt ccc atg atc aag cgc aag ttc tct 1273
Trp Lys His His Ala Glu Leu Gly Pro Met Ile Lys Arg Lys Phe Ser
365 370 375 380

5 gac cca gga gac gtc gag cgt gca cgc gag ttg gtc gag aaa agt gat 1321
Asp Pro Gly Asp Val Glu Arg Ala Arg Glu Leu Val Glu Lys Ser Asp
385 390 395

gga ttg gag aag acg aga gcc ttg gcg gag gag tat gcc cag aag gcg 1369
10 Gly Leu Glu Lys Thr Arg Ala Leu Ala Glu Glu Tyr Ala Gln Lys Ala
400 405 410

ttg gat gca att cggt acg ttc ccg gag agt ccg gca cggt aag gct ttg 1417
Leu Asp Ala Ile Arg Thr Phe Pro Glu Ser Pro Ala Arg Lys Ala Leu
15 415 420 425

gag cag ttg acg gac aag gtg ttg act agg tca aga taggaattcgagct 1467
Glu Gln Leu Thr Asp Lys Val Leu Thr Arg Ser Arg
430 435 440

20 cggttaccgg ggatccctcta gagtcgacacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg 1527

atgagagaag atttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa 1587

25 acagaatttg cctggcggca gtagcgcgggt ggtcccacacct gacccatgc cgaactcaga 1647

agtgaa 1653

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 2

<211> 440

<212> PRT

<213> Saioella complicata

5

<400> 2

Met Ala Ser Pro Ala Leu Arg Ile Arg Ser Ile Ser Ser Arg Ser
1 5 10 15
Ile Ala Ser Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Thr Ala Ser Ala Pro
10 20 25 30
Ser Leu Arg Leu Arg Cys Thr Pro Thr Ser Arg Pro Ser Ser Ser
35 40 45
Trp Ala Ala Ala Val Ser Ser Ala Ser Arg Leu Val Glu Pro Asp
50 55 60
15 Pro Asn Gln Pro Leu Ile Asn Pro Leu Asn Leu Val Gly Pro Glu
65 70 75
Met Ser Asn Leu Thr Ser Asn Ile Arg Ser Leu Leu Gly Ser Gly
80 85 90
His Pro Ser Leu Asp Thr Val Ala Lys Tyr Tyr Val Gln Ser Glu
20 95 100 105
Gly Lys His Ile Arg Pro Leu Met Val Leu Leu Met Ala Gln Ala
110 115 120
Thr Glu Val Ala Pro Lys Val Gln Gly Trp Glu Lys Val Val Glu
125 130 135
25 Val Pro Val Asn Glu Gly Leu Ala Pro Pro Glu Val Leu Asn Asp
140 145 150
Lys Asn Pro Asp Met Met Asn Met Arg Ser Gly Pro Leu Thr Lys
155 160 165
Asp Gly Glu Ile Glu Gly Gln Thr Ser Asn Ile Leu Ala Ser Gln

THIS PAGE BLANK (USP109)

	170	175	180
	Arg Arg Leu Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Ala Ala Ser Leu		
	185	190	195
	Leu His Asp Asp Val Ile Asp Ala Ser Glu Thr Arg Arg Asn Ala		
5	200	205	210
	Pro Ser Gly Asn Gln Ala Phe Gly Asn Lys Met Ala Ile Leu Ala		
	215	220	225
	Gly Asp Phe Leu Leu Gly Arg Ala Ser Val Ala Leu Ala Arg Leu		
	230	235	240
10	Arg Asn Pro Glu Val Ile Glu Leu Leu Ala Thr Val Ile Ala Asn		
	245	250	255
	Leu Val Glu Gly Glu Phe Met Gln Leu Lys Asn Thr Val Asp Asp		
	260	265	270
	Ala Ile Glu Ala Thr Ala Thr Gln Glu Thr Phe Asp Tyr Tyr Leu		
15	275	280	285
	Gln Lys Thr Tyr Leu Lys Thr Ala Ser Leu Ile Ala Lys Ser Cys		
	290	295	300
	Arg Ala Ser Ala Leu Leu Gly Gly Ala Thr Pro Glu Val Ala Asp		
	305	310	315
20	Ala Ala Tyr Ala Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe Gln Ile		
	320	325	330
	Val Asp Asp Met Leu Asp Tyr Thr Val Ser Ala Thr Asp Leu Gly		
	335	340	345
	Lys Pro Ala Gly Ala Asp Leu Gln Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro		
25	350	355	360
	Ala Leu Phe Ala Trp Lys His His Ala Glu Leu Gly Pro Met Ile		
	365	370	375
	Lys Arg Lys Phe Ser Asp Pro Gly Asp Val Glu Arg Ala Arg Glu		
	380	385	390

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Val Glu Lys Ser Asp Gly Leu Glu Lys Thr Arg Ala Leu Ala

395 400 405

Glu Glu Tyr Ala Gln Lys Ala Leu Asp Ala Ile Arg Thr Phe Pro

410 415 420

5 Glu Ser Pro Ala Arg Lys Ala Leu Glu Gln Leu Thr Asp Lys Val

425 430 435

Leu Thr Arg Ser Arg

440

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 9-173076, A (Alpha Shokuhin K.K.), 08 July, 1997 (08.07.97) (Family: none)	1-12
A	Suzuki. K., et al., "Analysis of the Decaprenyl Diphosphate Synthase (dps) Gene in Fission Yeast Suggests a Role of Ubiquinone as an Antioxidant", J. Biochem. (1997) Vol.121, pp.496-505	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 December, 2000 (12.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 9-173076, A (アルファー食品株式会社) 8.7月. 1997 (08.07.97) ファミリーなし	1-12
A	Suzuki.K., et al., "Analysis of the Decaprenyl Diphosphate Synthase (dps) Gene in Fission Yeast Suggests a Role of Ubiquinone as an Antioxidant", J. Biochem. (1997) Vol. 121, p. 496-505	1-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小暮 道明

4B 9358



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/830111

SC18 Rec'd PCT/PTO 23 APR 2001

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE
DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

Depositor Name KANEKA CORPORATION
Representative Masatoshi Takeda

Address
2-4, Nakanoshima 3-chome, Kita-ku, Osaka-shi

I. Description of the Microorganism	
(the description for identification as given by the depositor) E. coli DH5 α (pNT Sa1)	(Accession NO.) FERM BP-6844
II. Scientific Characteristics and Taxonomical Position	
<p>The microorganism of Column I has been deposited together with a document including the following information.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Scientific characteristics <input checked="" type="checkbox"/> Taxonomical position</p>	
III. Receipt and Acceptance	
<p>This international deposit authority accepts the deposit of the microorganism of Column I received on August 17, Heisei 11 (date of original deposit).</p>	
IV. Receipt of a Request for Transfer	
<p>This international deposit authority received the microorganism of Column I on , (date of original deposit). The authority further received a request for transfer from the original deposit to a deposit under Budapest Treaty on .</p>	
V. International Deposit Authority	
<p>Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Dr. Shinichi Ohashi, Director-General.</p>	
<p>Address: 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p>	
<p>August 17, Hei-11 (1999)</p>	

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） 瞳淵化学工業株式会社
寄託者 代表取締役 武田 正利
あて名 大阪市北区中之島三丁目二番四号

殿

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)
E. coli DH5 α (pNT Sal)

(受託番号)
FERM BP- 6844

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 11 年 8 月 17 日（原寄託日）に受領した1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1 欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency for Natural Resources and Energy
所 長 大曾 信一
Dr. Shin-ichi Oba

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番2号 (郵便番号305-8566)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

平成11年(1999) 8月17日

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 9-173076, A (Alpha Shokuhin K.K.), 08 July, 1997 (08.07.97) (Family: none)	1-12
A	Suzuki. K., et al., "Analysis of the Decaprenyl Diphosphate Synthase (dps) Gene in Fission Yeast Suggests a Role of Ubiquinone as an Antioxidant", J. Biochem. (1997) Vol.121, pp.496-505	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 December, 2000 (12.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

E P

U S

P C T

特許協力条約

09/830111

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 T549/QX-GT2	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPOO/05659	国際出願日 (日.月.年)	24.08.00	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 鐘淵化学工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。 この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎
 - a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
 - b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が、出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
4. 発明の名称は
 出願人が提出したものを承認する。
 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は
 出願人が提出したものを承認する。
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第_____図とする。 出願人が示したとおりである。 なし
 - 出願人は図を示さなかった。
 - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12P7/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

SwissProt/PIR/GenSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 9-173076, A (アルファー食品株式会社) 8.7月. 1997(08.07.97) ファミリーなし	1-12
A	Suzuki. K., et al., "Analysis of the Decaprenyl Diphosphate Synthase (dps) Gene in Fission Yeast Suggests a Role of Ubiquinone as an Antioxidant", J. Biochem. (1997) Vol. 121, p. 496-505	1-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小暮 道明

4 B 9358



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)